

**BEST AVAILABLE COPY**  
**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2001-095596

(43)Date of publication of application : 10.04.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/18  
C12N 1/00  
C12N 1/20  
C12N 1/38  
C12Q 1/24  
// (C12N 1/20  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:125 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:42 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:425 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 11-277101

(71)Applicant : SANYO ELECTRIC CO LTD

(22)Date of filing : 29.09.1999

(72)Inventor : IWAMA AKIFUMI

**(54) DETECTION OF HARMFUL SUBSTANCE**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting a harmful substance by the use of a microorganism in which the chemical sensitivity of the microorganism is utilized for expanding the range of detectable harmful substances.

**SOLUTION:** This method for detecting a harmful substance to judge whether the harmful substance is contained or not in a test sample comprises the following processes; a. a process for obtaining in a constant concentration a microorganism capable of proliferating in an artificial culture medium having specific conditions; b. a process for making a test culture medium containing a constant amount of the test sample and a control culture medium not containing the test sample in the same culture medium and then inoculating a constant amount of the microorganism in the centers of the culture media, respectively; c. a process for culturing the control culture medium and the test culture medium in the same culture conditions until the colony of the microorganism is observed; d. a process for comparing a colony formed in the test culture medium with the colony made in the control culture medium, and then measuring the difference; and e. a process for judging on the basis of the measured difference whether the harmful substance is contained or not in the test sample.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Process which obtains the microorganism which can be increased by fixed concentration in the artificial culture medium of the approach: a. specification conditions which are the detection approach of harmful matter of judging whether harmful matter existing, and include the following process in a test sample;  
b. Process which creates the trial culture medium which carried out constant-rate addition of the test sample on the same culture-medium conditions, and the contrast culture medium which is not added, and inoculates the microorganism of a constant rate into each at the core of a culture medium;  
c. Process which cultivates a contrast culture medium and a trial culture medium by the same culture condition until the colony of said microorganism is observed in a contrast culture medium;  
d. The process which judges whether harmful matter exists in a test sample based on process; which compares the gestalt-description of the colony formed in the trial culture medium, and the colony formed in the contrast culture medium, and measures a difference, and the difference of which e. measurement was done.

[Claim 2] The detection approach of the harmful matter characterized by using the time amount change pattern of the gestalt-description of a colony for said comparison by repeating Process d continuously or intermittently and performing it in the detection approach of harmful matter according to claim 1.

[Claim 3] In the detection approach of harmful matter according to claim 1 or 2, it sets on each culture-medium condition, using the pair of a trial culture medium and a contrast culture medium to which culture-medium conditions were changed in the specific range two or more. The detection approach of the harmful matter characterized by judging whether the gestalt-description of the colony formed in the trial culture medium and the colony formed in the contrast culture medium is compared, and harmful matter exists in a test sample based on those differences.

[Claim 4] The detection approach of the harmful matter characterized by using the phase diagram which expresses the relation between culture-medium conditions and the gestalt-description of a colony with the comparison of said colony to either of claim 1 to claims 3 in the detection approach of the harmful matter a publication.

[Claim 5] The detection approach of the harmful matter characterized by using the phase diagram which expresses the relation between culture-medium conditions and the time amount change pattern of the gestalt-description of a colony with the comparison of said colony to either of claim 1 to claims 4 in the detection approach of the harmful matter a publication.

[Claim 6] In the detection approach of the harmful matter a publication, the microorganism of the kind with which plurality differs in either of claim 1 to claims 5, or a stock, respectively independently Or mix at a specific rate and it cultivates in a single or two or more culture-medium conditions. The gestalt-description of the colony formed in each contrast culture

medium and trial culture medium, its time amount change pattern, and all the phase diagrams showing relation with culture-medium conditions Or the detection approach of the harmful matter characterized by judging whether either is compared and harmful matter exists in a test sample based on those differences.

[Claim 7] The detection approach of the harmful matter characterized by omitting the contrast culture-medium creation for every trial by measuring beforehand the gestalt-description of the colony formed in either of claim 1 to claims 6 in a contrast culture medium about each microorganism kind, a stock, or mixed microbial population in the detection approach of the harmful matter a publication, its time amount change pattern, those phase diagrams, and those error range.

[Claim 8] detection approach:a. of the harmful matter characterized by including the following processes in either of claim 1 to claims 7 in the detection approach of the harmful matter a publication as the parameter used for said comparison in a contrast culture medium, and a measuring method of the error range -- process; which obtains each microorganism or microbial population by fixed concentration

b. Process which creates two or more artificial culture media which changed culture-medium conditions gradually in the specific range, and inoculates the specific microorganism or the microbial population of a constant rate into each at the core of a culture medium;

c. Process cultivated by the same culture condition until the colony of the inoculated microorganism or microbial population is observed in each culture medium;

d. The process which obtains the gestalt-description of each average colony, and its error range from said b by repeating the process of d about process; which measures the gestalt-description of the average colony in each culture-medium condition, and its error range by repeating said b to c the number [ handling / a number / statistical ] of times and two or more microorganisms e. Different, or microbial population, and is put in a database.

[Claim 9] The detection approach of the harmful matter characterized by choosing said microorganism as either of claim 1 to claims 8 from the group to which it consists of Escherichia coli (Escherichia coli), a Bacillus subtilis (Bacillus subtilis), Salmonella (Salmonella), Proteus (Proteus), Serratia (Serratia), various variants of MIKUSO bacteria (Myxococcus), and those mixed microbial population in the detection approach of the harmful matter a publication.

[Claim 10] In the detection approach of harmful matter given in either of claim 1 to claims 9 Said test sample Drugs, a agricultural chemistry-product, a chemical, agricultural chemicals, food, The detection approach of the harmful matter characterized by being chosen out of those intermediate products, factory emissions, a pollutant, dust, waste fluid, water-and-sewage water, the water of a general river, a lake, and the sea, an underground water, the water from common soil or a solvent extraction object, storm sewage, and the group that consists of those combination objects.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the detection approach of harmful matter of judging using biological assay whether harmful matter being contained in the test sample.

[0002]

[Description of the Prior Art] In order to avoid that the general public for protection of the laborers of the production process which deals with harmful matter, and the consumer using the product containing it contacts the harmful matter (agricultural chemicals etc.) sprinkled intentionally or the harmful matter revealed in un-meaning, the harmful matter leakage monitor in a place of business etc. and the monitor of the harmful matter in an environment are performed.

[0003] As the one approach, a sample is extracted from target water, air, soil, etc., and measuring whether harmful matter is contained in it is performed. Specifically, the physicochemical analysis method of gas or a liquid chromatograph, a mass spectrum, etc. and the biological assay by which the activity of a living thing or change of activity is evaluated are used.

[0004] A physicochemical analysis method is the approach only now of carrying out the quantum of the harmful matter correctly for every class. However, in order to obtain sufficient sensibility, it is usually necessary to perform proper pretreatment to a test sample according to the measuring object.

[0005] Moreover, since this approach does not necessarily measure toxicity or the harmful nature itself, the judgment of harmful nature is performed by comparing a measurement result with a known harmful matter database.

[0006] Therefore, although this approach is the optimal as a monitor for checking that the concentration of the existence of leakage of the specific matter and the specific matter is below a reference value etc., it is seldom suitable as a monitor of a general environment which can specify beforehand neither evaluation of the unknown matter of harmful nature, nor the class of matter.

[0007] On the other hand, biological assay is the approach of medicating a living thing with a test sample and measuring the effect. Therefore, although neither the class of harmful matter in a sample nor an amount can be measured correctly, it can be judged immediately that harmful matter is in the sample.

[0008] For this reason, it is used as the one approach of a judgment and evaluation of the harmful nature of chemicals (for example, new drug etc.) that evaluation of harmful nature has not become settled. And into the general environment, it is thought that it is useful also as a monitor method for judging whether there is any harmful matter, and application is advanced.

[0009] However, when harmful matter is discovered, there are many opportunities used as a prescreening method performed on the preceding paragraph story of a physicochemical analysis method in practice for the cure since the class of harmful matter and the data of an amount are need.

[0010] In the hazard assessment of each chemical using biological assay, since it is necessary to evaluate the harmful nature of the matter from various include angles, very many approaches, such as an approach using a \*\* (\*\*) object individual, the organ isolated or cultivated and an organization and a cell, and a microorganism, are established.

[0011] On the other hand, the present condition is that there is no conventional method established about the biological assay as an object for environmental monitors. Although various living things and a measurement parameter are chosen by the measuring object, it is advantageous to use the microorganism in which it is comparatively simple, considering

simplicity and to judge quickly and cheaply, and growth has early and versatility in many test samples.

[0012] The harmful matter detection approach of the type which detects the fall of the metabolic activity from which harmful matter happens by checking the enzyme of the main metabolic fates of a microorganism by current, the type which detects the variation incidence which happens when harmful matter acts on Microorganism DNA, and the type which detects the action (chemotaxis) based on the chemical sense of a microorganism, or the toxic evaluation approach of a chemical is developed.

[0013]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] If it takes into consideration using for the harmful matter monitor in a general environment, since it cannot assume beforehand what kind of harmful matter exists, it becomes the biggest technical problem which can measure many matter by high sensitivity broadly.

[0014] Since conventional methods other than the approach using chemotaxis mainly detected the intracellular effect of a microorganism, and sharp measurement was hardly undetectable about the matter whose essence of being restricted to the matter which is easy to pass a cell membrane, and harmful nature is neither an enzyme nor the operation to DNA, the range of a chemical detectable by high sensitivity was limited. That is, when it used as an environmental monitor, there was a possibility of overlooking existence of much harmful matter.

[0015] On the other hand, a microorganism acts as the monitor of its own environment using a chemical sense, takes in a required nutrient, and avoids the harmful matter for itself. The microbial population which grows various existences of a microorganism by different environment has suggested that the range of the chemical which can be sensed sharp also differs.

[0016] Therefore, if the class of microorganism and a variant are chosen appropriately and it uses combining a chemical sense peculiar to each, the range of the chemical which can respond may be sharply expandable.

[0017] However, only by the trial using the chemotaxis used conventionally, the class and culture-medium conditions of the microorganism which can be used are limited, and there was a problem that harnessing the merit using a chemical sense could not be finished enough.

[0018] This invention is made in view of said technical problem, and it aims at offering the detection approach of harmful matter of having used the function of the chemical sense which the microorganism itself has in addition to metabolic turnover / growth activity of the microorganism conventionally used for measurement in order to make it possible to detect various matter by high sensitivity.

[0019]

[Means for Solving the Problem] In order to attain said purpose, in this invention, this was used paying attention to the action based on the chemical sense of each microorganism being reflected into like the formation fault of a colony. That is, since the microorganism of the same class also forms the colony of various gestalten corresponding to nutrition concentration, harmful matter concentration, etc., it can judge whether harmful matter exists in a test sample by comparing with the colony formed by the culture medium which measures like the gestalt and formation fault of the colony formed by the culture medium which put in the test sample, and does not put in a test sample. Process which consists of a process from a to e shown below as the concrete approach for realizing this, and obtains the microorganism which can be increased by fixed concentration in the artificial culture medium of a. specification conditions;

b. Process which creates the trial culture medium which carried out constant-rate addition of the test sample on the same culture-medium conditions, and the contrast culture medium which is not added, and inoculates the microorganism of a constant rate into each at the core

of a culture medium;

c. Process which cultivates a contrast culture medium and a trial culture medium by the same culture condition until the colony of said microorganism is observed in a contrast culture medium;

d. The process which evaluates possibility that harmful matter exists in a test sample, based on process; which compares the gestalt-description of the colony formed in the trial culture medium, and the colony formed in the contrast culture medium, and measures a difference, and the difference of which e. measurement was done.

[0020] In the detection approach of said harmful matter, it can be expressed now by repeating Process d continuously or intermittently and performing it, using transition of the gestalt-description of a colony as the time amount change pattern. In this way, it is possible to judge whether harmful matter exists in a test sample by using the obtained time amount change pattern for a comparison parameter.

[0021] Furthermore, in the detection approach of said harmful matter, if culture-medium conditions are changed in the specific range and the pair of two or more trial culture media and a contrast culture medium is used, still more detailed measurement will be attained. It is possible to judge whether harmful matter exists in a test sample by comparing the gestalt-description of the colony formed in the trial culture medium in each culture-medium condition and the colony formed in the contrast culture medium, and examining those differences synthetically.

[0022] Moreover, in the detection approach of said harmful matter, it is possible to judge whether harmful matter exists in a test sample by creating the phase diagram showing the relation between culture-medium conditions and the gestalt-description of the measured colony, and using this for the comparison of the aforementioned colony.

[0023] the phase diagram which expresses the relation between culture-medium conditions and the time amount change pattern of the gestalt-description of a colony in the detection approach of said harmful matter -- creating -- \*\*\*\* for a comparison of said colony -- it is possible to judge whether harmful matter exists in a test sample by things.

[0024] In the detection approach of said harmful matter, the microorganism of the kind with which plurality differs, or a stock, respectively moreover, independently Or mix at a specific rate and it cultivates in a single or two or more culture-medium conditions. Either of the phase diagrams showing the relation between the gestalt-description of the colony formed in each contrast culture medium and trial culture medium, its time amount change pattern, and culture-medium conditions, Or it is possible to judge whether all are compared and harmful matter exists in a test sample based on those differences.

[0025] In the detection approach of said harmful matter, even if it omits the contrast culture-medium creation for every trial by measuring beforehand the gestalt-description of the colony formed in a contrast culture medium about each kind, a stock, or mixed microbial population, its time amount change pattern, those phase diagrams, and those error range, it is possible to judge whether harmful matter exists in a test sample.

[0026] from the process of the following a as each comparison parameter [ in / on the detection approach of said harmful matter, and / a contrast culture medium ], and a measuring method of error range to e -- becoming -- a. -- process; which obtains each microorganism or microbial population by fixed concentration

b. Process which creates two or more artificial culture media which changed culture-medium conditions gradually in the specific range, and inoculates the specific microorganism or the microbial population of a constant rate into each at the core of a culture medium;

c. Process cultivated by the same culture condition until the colony of the inoculated microorganism or microbial population is observed in each culture medium;

d. The process which obtains the gestalt-description of each average colony, and its error range from said b by repeating the process of d about process; which measures the gestalt-

description of the average colony in each culture-medium condition, and its error range by repeating said b to c the number [ handling / a number / statistical ] of times and two or more microorganisms e. Different, or microbial population, and is put in a database.

[0027] In the detection approach of said harmful matter, the microorganism which can be used can be chosen from Salmonella (Salmonella) including the various variants of Escherichia coli (Escherichia coli) and a Bacillus subtilis (Bacillus subtilis), Proteus (Proteus), Serratia (Serratia), the various variants of MIKUSO bacteria (Myxococcus), and the group that consists of those mixed microbial population.

[0028] Said measurable test sample is chosen from drugs, a agricultural chemistry-product, a chemical, agricultural chemicals, food, those intermediate products, factory emissions, a pollutant, dust, waste fluid, water-and-sewage water, the water of a general river, a lake, and the sea, an underground water, the water from common soil or a solvent extraction object, storm sewage, and the group that consists of those combination objects by the detection approach of said harmful matter.

[0029]

[Embodiment of the Invention] The example using two kinds of microorganisms currently reflected as colony morphosis of a format from which the action based on a chemical sense differs, and the difference differs is explained below.

Example 1 : in the example of the example [microorganism and motile check] beginning of use of the microorganism which has maneuverability in a half fluidity culture medium The microorganism ensemble inoculated into one point repeats movement and growth using the microorganism which has maneuverability in a half-fluidity culture medium. The colony pattern of the radial to form ( ) [ E.] O.Budrene and H.C. Berg, Complex patterns formed by motile cells of Escherichia coli, Nature, vol.349, p.630-633, and 1991, it is indicated in detail -- \*\*\*\* -- it used. Here, three kinds of stocks (K2 share, 21 shares of BL(s), 109 shares of JM) of Escherichia coli (Escherichia coli) were used as a microorganism. If it is the microorganism which shows maneuverability and chemotaxis (for example, a salmonella, Bacillus proteus vulgaris, a Bacillus subtilis, etc.), all can be used similarly.

[0030] However, when using a new microorganism, it is desirable to grasp somewhat beforehand the maneuverability of the microorganism and the pattern of how to be able to do culture-medium conditions and a colony. The culture medium with which the microorganism went into the slide glass is carried out under one-drop \*\*, and that a microorganism has maneuverability can check it by looking easily by microscope observation. Observation of a colony pattern should just use the same approach as culture by the contrast culture medium described below.

The process of the beginning of the [approach of culture and trial] invention is a process which cultivates a microorganism by fixed concentration. Escherichia coli is inoculated into an artificial culture medium in a trial, and the subsequent colony morphosis is observed. At this time, if the first number of microorganisms is not fixed, depending on time amount required for colony formation, and conditions, a difference may appear in the colony gestalt itself.

[0031] for this reason, beforehand, a microorganism is increased in a liquid medium so that it may become fixed concentration -- making -- it -- constant-rate \*\*\*\* -- a fixed number of microorganisms by things are used by trial. Cultivating is convenient until it is saturated in culture medium, in order to make concentration regularity.

[0032] Here, the liquid medium which was mixed one kind to the M9 minimal medium, and created the carbon source to it was used for culture-medium conditions. The carbon source chose from the matter in a citric acid cycle (succinic acid etc.). Although the above culture-medium conditions may change the class of matter, and an amount, they need to perform a preliminary test beforehand and need to decide whether it is suitable for the microorganism to be used.

[0033] In addition, although not stated in detail, it is necessary to use the usual microbiological technique and know-how also including sterilization actuation at the time of culture-medium creation and the handling of a microorganism.

[0034] Using the platinum loop, little ON \*\*\*\* and after mixing, \*\*\*\* culture of the microorganism used for 2ml of created culture medium at a trial was carried out by part for 37 degrees C and 120 cycle/for 24 hours. By this culture, microorganism concentration rose from the 9th power of about 10 to 10th power piece [/ml / about ] concentration, and it will be saturated. This culture condition is conditions usually used well, and if made to fixed concentration, it will not be limited to the conditions and approach which were shown here.

[0035] In order to investigate concentration, the microorganism in culture medium may be directly counted by microscope observation, and the rate of the absorption of light may be measured and calculated using a spectrophotometer etc., and it dilutes further, and it may cultivate by the standard culture medium and the colony count created may be counted. any -- the law of microbiology -- it is the approach established as a method and is not limited to the technique.

[0036] On the other hand, it was parallel to said culture and the culture medium was created. Here, an agar (concentration: 0.25%), M9 salts, four kinds of amino acid (L-methionine, L-threonine, L-leucine, L-histidine), and the culture medium that consists of a carbon source (succinic acid) were created. It put 10ml of this culture medium at a time into the plastics petri dish with a diameter of 9cm, and the petri dish was divided into two groups. before an agar becomes hard -- a group -- a petri dish -- as a reference solution -- ethanol -- respectively -- every 0.1ml -- putting in -- stirring -- already -- a group -- on the petri dish, it put in at a time 0.1ml (ethanol which has melted beforehand matter - currently suspected as nonyl phenol-endocrine disruptors) of test sample solutions, and they were stirred, respectively. The petri dish was left in the room temperature, the agar was solidified, and the half-fluidity culture medium the object for contrast and for a trial was created.

[0037] The adhesion kind of the microorganism culture medium 10 microliter (it is made the number of microorganisms and is the 7 - 8th power individual of about 10) created above was carried out to the created contrast culture medium and the trial culture medium near the center of a petri dish, respectively. The inoculated petri dish was put into the 25-degree C incubator, from 24 hours, was put for 72 hours and cultivated. In the Escherichia coli used here, it was observed in the contrast culture medium that the small spot in which the microorganism flocked by 72 hours is distributed widely.

[0038] The clear difference was looked at by the number of the spots, size, regularity, etc. when the colony pattern formed in the shape of a spot was compared between the contrast culture medium and the trial culture medium. This difference is the effect which the test sample (in this case, nonyl phenol) put into the trial culture medium had.

[0039] If such a difference appears when the sample extracted from the environment is used, possibility that a certain harmful matter is contained in the sample will be shown. For a quantitative comparison, photography and video photography are performed, it downloads to a computer, image analysis is performed, and measuring is possible. It is thought that it will become possible the class of harmful matter included in inside and to presume an amount etc. only from the difference which appeared here in the future if the same trial as the above is performed by various matter and concentration and the relation between the difference in colony formation and the matter is put in a database, although it cannot do in the present condition.

[0040] Furthermore, the database about various microorganisms is created for this, the effect of the same test sample is investigated using two or more microorganisms, and detailed evaluation is attained by collating with a database.

example 2: -- the example of use of the microorganism increased in the shape of a string in a solid medium [a microorganism and a migratory check] -- in this example, while the

microorganism inoculated into one point had stood in a row in the shape of a string using the microorganism which has migratory in a solid medium, growth was repeated, and the microorganism which can occupy a large area by that cause to a colony was used. Here, one kind of stock (I2 share) of a *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis*) was used as a microorganism. If a colony can be increased over the large range on a solid medium, it can use similarly except the microorganism shown here.

[0041] However, when using a new microorganism, it is desirable to grasp somewhat beforehand the culture-medium conditions of the microorganism and the format of how to be able to do a colony. Observation of a colony pattern should just use the same approach as culture by the contrast culture medium described below.

The process of the beginning of the [approach of culture and trial] invention is a process which cultivates a microorganism by fixed concentration. A *Bacillus subtilis* is inoculated into an artificial culture medium in a trial, and the subsequent colony morphosis is observed. At this time, if the number of microorganisms is not fixed, depending on time amount required for colony formation, and conditions, a difference will appear in the colony gestalt itself.

[0042] for this reason, a microorganism is increased in a liquid medium so that it may become fixed concentration beforehand -- making -- it -- constant-rate \*\*\*\* -- it enables it to use a fixed number of microorganisms by things by trial In addition, cultivating is convenient until it is saturated in culture medium, in order to make concentration regularity.

[0043] Here, 10% solution of a nutrient broth (Nutrition research) was used for culture-medium conditions. Although this culture-medium condition may change the class of matter, and an amount, it needs to decide beforehand whether it is suitable for the microorganism to be used by the preliminary test.

[0044] Using the platinum loop, little ON \*\*\*\* and after mixing, \*\*\*\* culture of the microorganism used for 2ml of created culture medium at a trial was carried out by part for 37 degrees C and 120 cycle/for 24 hours. By this culture, microorganism concentration rose from the 9th power of about 10 to 10th power piece [/ml / about ] concentration, and it will be saturated. This culture condition is conditions usually used well, and if made to fixed concentration, it will not be limited to the conditions shown here. in order to investigate concentration -- the law of said microbiology carried out -- the approach established as a method is used.

[0045] On the other hand, it was parallel to said culture and the culture medium was created. Here, an agar (0.5%) and the culture medium which consists of a nutrient broth (10%) were created. It put 10ml of this culture medium at a time into the plastics petri dish with a diameter of 9cm, and the petri dish was divided into two groups. before an agar becomes hard -- a group -- a petri dish -- as a reference solution -- ethanol -- respectively -- every 0.1ml -- putting in -- stirring -- already -- a group -- on the petri dish, it put in at a time 0.1ml (ethanol which has melted beforehand matter - currently suspected as nonyl phenol-endocrine disruptors) of test sample solutions, and they were stirred, respectively. The petri dish was left in the room temperature, the agar was solidified, and the contrast culture medium and the trial culture medium were created.

[0046] The adhesion kind of the microorganism culture medium 10 microliter (it is made the number of microorganisms and is the 7 - 8th power individual of about 10) created above was carried out to the created contrast culture medium and the trial culture medium near the center of a petri dish, respectively. The inoculated petri dish was put into the 25-degree C incubator, from 24 hours, was put for 72 hours and cultivated. With the *Bacillus subtilis* used here, the colony with a diameter of about 3-5 centimeters was observed in the contrast culture medium in about 24 hours.

[0047] The pattern of the formed colony was compared between the contrast culture medium and the trial culture medium. The qualitative not much big difference was not seen about a

macroscopic colony gestalt.

[0048] However, although the cell connected in the shape of a string to the colony of a trial culture medium although the colony of a contrast culture medium was formed in the cell connected in the shape of a string when the element which forms a colony was observed under the microscope was also observed, in addition to it, it was made the number of cells, and the string with short extent, the thing divided into the single cell were observed partly. For the quantitative comparison, a photograph was taken, it downloaded to the computer, and the diameter of a colony, the area of a colony, the die length for a string-like part, the number of amputation stumps, the fractal dimension of a colony gestalt, etc. were measured.

[0049] The difference was seen between the colonies of a contrast culture medium and a trial culture medium also about which parameter. This difference is the effect which the sample (in this case, nonyl phenol) put into the trial culture medium had. If such a difference appears when the sample extracted from the environment is used, possibility that a certain harmful matter is contained in the sample will be shown. Although neither the class of harmful matter included in inside nor an amount can be presumed in the present condition only from the difference which appeared here, if the same trial as the above is performed by various matter and concentration and the relation between a difference and the matter is put in a database, it will become possible in the future. Furthermore, the database about various microorganisms is created for this, the effect of the same test sample is investigated about two or more microorganisms, and detailed evaluation is attained by collating with a database.

[0050]

[Effect of the Invention] Since the chemical sense is also used [ according to this invention ] in addition to the proliferation potential force which a microorganism has so that clearly from the above explanation, sensibility is improved by measurement compared with detection of only enzyme activity. Moreover, the correspondence to various chemicals is attained by using combining a microorganism with the property in which the susceptibility of the matter differs.

[0051] For this reason, it can evaluate simple whether it is that harmful matter exists in a test sample as a monitor of the harmful matter of a general environment at low cost, and quickly. In various scenes, it can use effectively like the use as a method of examining the preceding paragraph story of physicochemical analysis. Moreover, even if independent, it can use as the toxicity of a chemical, or the evaluation approach of harmful nature.

---

[Translation done.]

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-095596

(43)Date of publication of application : 10.04.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/18  
C12N 1/00  
C12N 1/20  
C12N 1/38  
C12Q 1/24  
// (C12N 1/20  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:125 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:42 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:425 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 11-277101

(71)Applicant : SANYO ELECTRIC CO LTD

(22)Date of filing : 29.09.1999

(72)Inventor : IWAMA AKIFUMI

## (54) DETECTION OF HARMFUL SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a harmful substance by the use of a microorganism in which the chemical sensitivity of the microorganism is utilized for expanding the range of detectable harmful substances.

SOLUTION: This method for detecting a harmful substance to judge whether the harmful substance is contained or not in a test sample comprises the following processes; a. a process for obtaining in a constant concentration a microorganism capable of proliferating in an artificial culture medium having specific conditions; b. a process for making a test culture medium containing a constant amount of the test sample and a control culture medium not containing the test sample in the same culture medium and then inoculating a constant amount of the microorganism in the centers of the culture media, respectively; c. a process for culturing the control culture medium and the test culture medium in the same culture conditions until the colony of the microorganism is observed; d. a process for comparing a colony formed in the test culture medium with the colony made in the control culture medium, and then measuring the difference; and e. a process for judging on the basis of the measured difference whether the harmful substance is contained or not in the test sample.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-95596  
(P2001-95596A)

(43) 公開日 平成13年4月10日 (2001. 4. 10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	特許出願公開番号
C 1 2 Q	1/18	C 1 2 Q	1/18
C 1 2 N	1/00	C 1 2 N	1/00
	1/20		1/20
	1/38		1/38
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-277101  
(22) 出願日 平成11年9月29日 (1999. 9. 29)

(71) 出願人 000001889  
三洋電機株式会社  
大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号  
(72) 発明者 岩間 明文  
大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号 三  
洋電機株式会社内  
(74) 代理人 100111383  
弁理士 芝野 正雅  
Fターム(参考) 4B063 QA01 QA06 QA17 QQ16 QQ17  
QQ18 QQ19 QQ61 QQ99 QR69  
QR75 QR80 QS10 QX01  
4B065 AA19X AA26X AA40X AA46X  
AA48X AC12 BA16 BC11  
BC37 CA46 CA54

(54) 【発明の名称】 有害物質の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 微生物を利用した有害物質の検出方法において、検出可能な有害物質の範囲を広げるため、微生物の化学感覚を利用する方法を提供する。

【解決手段】 試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定する有害物質の検出方法であって、下記の工程を含む方法：a. 特定条件の人工培地において増殖可能な微生物を一定濃度で得る工程；b. 同一の培地条件で試験サンプルを一定量添加した試験培地と、添加しない対照培地とを作成し、それぞれに一定量の微生物を培地の中心に接種する工程；c. 前記微生物のコロニーが対照培地において観察されるまで、対照培地と試験培地とを同一の培養条件で培養する工程；d. 試験培地において形成されたコロニーと、対照培地において形成されたコロニーとの形態的特徴を比較し、差異を測定する工程；e. 測定された差異に基づいて、試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定する工程。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定する有害物質の検出方法であって、下記の工程を含む方法：

- a. 特定条件の人工培地において増殖可能な微生物を一定濃度で得る工程；
- b. 同一の培地条件で試験サンプルを一定量添加した試験培地と、添加しない対照培地とを作成し、それぞれに一定量の微生物を培地の中心に接種する工程；
- c. 前記微生物のコロニーが対照培地において観察されるまで、対照培地と試験培地とを同一の培養条件で培養する工程；
- d. 試験培地において形成されたコロニーと、対照培地において形成されたコロニーとの形態的特徴を比較し、差異を測定する工程；及び
- e. 測定された差異に基づいて、試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定する工程。

【請求項2】 請求項1記載の有害物質の検出方法において、工程dを連続的、又は、断続的に繰り返すことで、コロニーの形態的特徴の時間変化パターンを前記比較に用いることを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項3】 請求項1又は請求項2記載の有害物質の検出方法において、培地条件を特定の範囲で変化させた試験培地と対照培地の対を複数用いて、それぞれの培地条件において、試験培地にて形成されたコロニーと、対照培地にて形成されたコロニーの形態的特徴を比較し、それらの差異に基づいて試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項4】 請求項1から請求項3のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、前記コロニーの比較に、培地条件とコロニーの形態的特徴との関係を表わす相図を用いることを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項5】 請求項1から請求項4のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、前記コロニーの比較に、培地条件とコロニーの形態的特徴の時間変化パターンとの関係を表わす相図を用いることを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項6】 請求項1から請求項5のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、複数の異なる種又は株の微生物を、それぞれ単独で、又は特定の割合で混合して、単一又は複数の培地条件において培養し、それぞれの対照培地と試験培地とにおいて形成されたコロニーの形態的特徴、その時間変化パターン、培地条件との関係を表わす相図のすべて、又は、いずれかを比較し、それらの差異に基づいて試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項7】 請求項1から請求項6のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、それぞれの微生物

種、株、又は、混合微生物群について、対照培地において形成されるコロニーの形態的特徴、その時間変化パターン、それらの相図、及び、それらの誤差範囲をあらかじめ測定しておくことにより、試験ごとの対照培地作成を省略することを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項8】 請求項1から請求項7のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、対照培地における前記比較に用いるパラメータとその誤差範囲の測定方法として以下の工程を含むことを特徴とする有害物質の検出方法：

- a. それぞれの微生物又は微生物群を一定濃度で得る工程；
- b. 特定の範囲において、培地条件を段階的に変えた人工培地を複数作成し、それぞれに一定量の特定の微生物又は微生物群を培地の中心に接種する工程；
- c. それぞれの培地において、接種した微生物又は微生物群のコロニーが観察されるまで、同一の培養条件で培養する工程；
- d. 前記bからcを統計的取り扱いが可能な回数繰り返すことで、それぞれの培地条件における平均的なコロニーの形態的特徴及びその誤差範囲を測定する工程；及び
- e. 異なる複数の微生物又は微生物群について、前記bからdの工程を繰り返すことで、それぞれの平均的なコロニーの形態的特徴及びその誤差範囲を得て、データベース化する工程。

【請求項9】 請求項1から請求項8のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、前記微生物が、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、プロテウス属 (*Proteus*)、セラチア属 (*Serratia*)、ミクソバクテリア (*Myxococcus*) の各種変異株、及び、それらの混合微生物群からなる群から選ばれたものであることを特徴とする有害物質の検出方法。

【請求項10】 請求項1から請求項9のいずれかに記載の有害物質の検出方法において、前記試験サンプルが、医薬品、農薬化学的製品、化学物質、農薬、食品、それらの中間生成物、工場排出物、汚染物質、ゴミ、廃液、上下水道水、一般河川・湖沼・海の水、地下水、一般土壌からの水又は溶媒抽出物、雨水、及び、それらの組み合わせ物からなる群から選ばれたものであることを特徴とする有害物質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試験サンプル中に有害物質が含まれているか否かを生物検定法を用いて判定する有害物質の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】有害物質を取り扱う製造工程の労働者や、それを含む製品を利用する消費者の保護のため、また、一般の人々が意図的に散布された有害物質（農薬な

ど)又は非意図的に漏洩した有害物質などに接触することを避けるため、事業所などにおける有害物質漏洩モニターや、環境中の有害物質のモニターが行われている。

【0003】その一つの方法として、対象となる水、空気、土などからサンプルを採取し、その中に有害物質が含まれるか否かを測定することが行われている。具体的には、ガス又は液体クロマトグラフ、マススペクトルなどの物理化学的分析法と、生物の活動又は活性の変化を評価する生物検定法とが用いられている。

【0004】物理化学的分析法は、有害物質を種類ごとに正確に定量できる現在唯一の方法である。しかし、十分な感度を得るためには、通常、測定対象に応じて適正な前処理を試験サンプルに施す必要がある。

【0005】また、この方法は毒性又は有害性そのものを測定するわけではないので、有害性の判定は測定結果を既知の有害物質データベースと照らし合わせることで行われる。

【0006】従って、この方法は、特定の物質の漏洩の有無や、特定の物質の濃度が基準値以下であることなどを確認するためのモニターとしては最適であるが、有害性の不明な物質の評価や、物質の種類をあらかじめ特定できない一般環境のモニターとしてはあまり適さない。

【0007】一方、生物検定法は、試験サンプルを生物に投与し、その影響を測定する方法である。従って、サンプル中の有害物質の種類や、量を正確に測定することはできないが、そのサンプル中に有害物質があることは直ちに判定できる。

【0008】このため、有害性の評価が定まっていない化学物質(例えば、新薬など)の有害性の判定・評価の一方法として利用されている。そして、一般環境中に有害物質があるか否かを判定するためのモニター法としても有用と考えられ、適用が進められている。

【0009】ただし、有害物質が発見された場合、その対策のために有害物質の種類、量のデータが必要なので、実際的には物理化学的分析法の前段階に行うプレスクリーニング法として利用される機会が多い。

【0010】生物検定法を用いた個々の化学物質の有害性評価においては、様々な角度から物質の有害性を評価する必要があるため、動(植)物個体、単離又は培養した器官・組織・細胞、微生物を用いる方法など実に多くの方法が確立されている。

【0011】一方、環境モニター用としての生物検定法については、確立された常法はないのが現状である。測定対象によって様々な生物や、測定パラメータが選ばれているが、多数の試験サンプルを簡便、迅速、安価に判定することを考えると比較的単純で、増殖が早く、かつ、多様性のある微生物を用いるのが有利である。

【0012】現在までに、有害物質が微生物の主要な代謝経路の酵素を阻害することで起こる代謝活性の低下を検出するタイプ、有害物質が微生物DNAに作用するこ

とにより起こる変異出現率を検出するタイプ、微生物の化学感覚を基にした行動(走化性)を検出するタイプの有害物質検出方法又は化学物質の毒性評価方法が開発されている。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】一般環境での有害物質モニターに使うことを考慮すると、どのような有害物質が存在するのかをあらかじめ想定できないので、どれだけ多くの物質を幅広く高感度で測定できるかということが最大の課題となる。

【0014】走化性を用いた方法以外の従来法は、主に微生物の細胞内での影響を検出するので鋭敏な測定は細胞膜を通過しやすい物質に限られること、有害性の本質が酵素や、DNAへの作用ではない物質についてはほとんど検出できないことから、高感度で検出可能な化学物質の範囲が限定されていた。つまり、環境モニターとして利用した場合、多くの有害物質の存在を見落とししてしまうおそれがあった。

【0015】一方で、微生物は化学感覚を用いて自分自身の環境をモニターして、必要な栄養分を摂取し、自分にとって有害な物質を避けている。多様な微生物の存在は、異なる環境に生育する微生物群は鋭敏に感じることでできる化学物質の範囲も異なっていることを示唆している。

【0016】従って、微生物の種類、変異株を適切に選択してそれぞれに特有な化学感覚を組み合わせれば、対応できる化学物質の範囲を大幅に拡大できる可能性がある。

【0017】ところが、従来より用いられている走化性を用いた試験のみでは、利用できる微生物の種類や、培地条件が限定されており、化学感覚を利用するメリットが充分活かしきれないという問題があった。

【0018】本発明は、前記課題に鑑みなされたものであり、多様な物質を高感度で検出することを可能とするために従来より測定に利用されてきた微生物の代謝・増殖活性に加えて、微生物自身が持つ化学感覚の機能を利用した有害物質の検出方法を提供することを目的とする。

【0019】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、本発明においては、個々の微生物の化学感覚に基づいた行動がコロニーの形成過程の中に反映されていることに着目し、これを利用した。すなわち、同じ種類の微生物でも、栄養濃度、有害物質濃度などに対応して様々な形態のコロニーを形成するので、試験サンプルを入れた培地で形成されたコロニーの形態や、形成過程を測定し、試験サンプルを入れない培地で形成されたコロニーと比較することで、試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することができる。これを実現するための具体的方法として、以下に示すaからeまでの工程が

らなり、

- a. 特定条件の人工培地において増殖可能な微生物を一定濃度で得る工程；
- b. 同一の培地条件で試験サンプルを一定量添加した試験培地と、添加しない対照培地とを作成し、それぞれに一定量の微生物を培地の中心に接種する工程；
- c. 前記微生物のコロニーが対照培地において観察されるまで、対照培地と試験培地とを同一の培養条件で培養する工程；
- d. 試験培地において形成されたコロニーと、対照培地において形成されたコロニーとの形態的特徴を比較し、差異を測定する工程；及び
- e. 測定された差異に基づいて、試験サンプル中に有害物質が存在する可能性を評価する工程。

【0020】前記有害物質の検出方法において、工程dを連続的、又は、断続的に繰り返し行うことで、コロニーの形態的特徴の推移をその時間変化パターンとして、表現できるようになる。こうして得た時間変化パターンを比較パラメーターに用いることで、試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0021】更に、前記有害物質の検出方法において、培地条件を特定の範囲で変化させて、複数の試験培地と対照培地の対を用いると更に詳細な測定が可能となる。それぞれの培地条件での試験培地において形成されたコロニーと、対照培地において形成されたコロニーの形態的特徴を比較し、それらの差異を総合的に検討することで試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0022】また、前記有害物質の検出方法において、培地条件と測定したコロニーの形態的特徴との関係を表わす相図を作成し、これを前記のコロニーの比較に用いることで試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0023】前記有害物質の検出方法において、培地条件とコロニーの形態的特徴の時間変化パターンとの関係を表わす相図を作成し、前記コロニーの比較用いることで試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0024】また、前記有害物質の検出方法において、複数の異なる種又は株の微生物を、それぞれ単独で、又は特定の割合で混合して、単一又は複数の培地条件において培養し、それぞれの対照培地と試験培地とにおいて形成されたコロニーの形態的特徴、その時間変化パターン、培地条件との関係を表わす相図のいずれか、又は、すべてを比較し、それらの差異に基づいて試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0025】前記有害物質の検出方法において、それぞれの種、株、又は、混合微生物群について、対照培地に

て形成されるコロニーの形態的特徴、その時間変化パターン、それらの相図、及び、それらの誤差範囲をあらかじめ測定しておくことにより、試験ごとの対照培地作成を省略しても、試験サンプル中に有害物質が存在するか否かを判定することが可能である。

【0026】前記有害物質の検出方法において、対照培地における各比較パラメータと誤差範囲の測定方法として以下のaからeの工程からなり、

- a. それぞれの微生物又は微生物群を一定濃度で得る工程；
- b. 特定の範囲において、培地条件を段階的に変えた人工培地を複数作成し、それぞれに一定量の特定の微生物又は微生物群を培地の中心に接種する工程；
- c. それぞれの培地において、接種した微生物又は微生物群のコロニーが観察されるまで、同一の培養条件で培養する工程；
- d. 前記bからcを統計的取り扱いが可能な回数繰り返すことで、それぞれの培地条件における平均的なコロニーの形態的特徴及びその誤差範囲を測定する工程；及び
- e. 異なる複数の微生物、又は、微生物群について、前記bからdの工程を繰り返すことで、それぞれの平均的なコロニーの形態的特徴及びその誤差範囲を得て、データベース化する工程。

【0027】前記有害物質の検出方法において、用いることのできる微生物は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の各種変異株をはじめとして、サルモネラ属 (*Salmonella*)、プロテウス属 (*Proteus*)、セラチア属 (*Serratia*)、ミクソバクテリア (*Myxococcus*) の各種変異株、及び、それらの混合微生物群からなる群から選ぶことができる。

【0028】前記有害物質の検出方法で測定可能な前記試験サンプルは、医薬品、農芸化学的製品、化学物質、農薬、食品、それらの中間生成物、工場排出物、汚染物質、ゴミ、廃液、上下水道水、一般河川・湖沼・海の水、地下水、一般土壌からの水又は溶媒抽出物、雨水、及び、それらの組み合わせ物からなる群から選ばれる。

【0029】

【発明の実施の形態】化学感覚に基づく行動が異なり、その違いが異なる様式のコロニー形成過程として反映されている2種類の微生物を用いた例について、以下に説明する。

実施例1：半流動性培地において運動性を持つ微生物の利用例

〔微生物と運動性の確認〕最初の例では、半流動性培地において運動性を持つ微生物を用いて、一点に接種された微生物集団が運動と増殖を繰り返して、形成する放射状のコロニーパターン (E. O. Budrene and H. C. Berg, Complex patterns formed by motile cells of *Escherichia coli*, Nature, vol.349, p.630-633, 1991, に詳しく記載されている) を利用した。ここでは、微生物と

して大腸菌 (*Escherichia coli*) の3種類の株 (K2株、BL21株、JM109株) を用いた。運動性と化学走性を示す微生物 (例えば、サルモネラ菌、プロテウス菌、枯草菌など) であればいずれも同様に用いることができる。

【0030】但し、新規な微生物を用いる場合は、その微生物の運動性と、培地条件とコロニーのでき方のパターンをある程度、あらかじめ把握しておくことが望ましい。微生物が運動性を持つことは、スライドグラスに微生物の入った培養液を一滴滴下し、顕微鏡観察で簡単に視認できる。コロニーパターンの観察は、以下に記す対照培地での培養と同様な方法を用いればよい。

〔培養と試験の方法〕発明の最初の工程は、微生物を一定濃度で培養する工程である。試験においては、大腸菌を人工培地に接種し、その後のコロニー形成過程を観察する。このとき、最初の微生物数が一定でないとコロニー形成に必要な時間や、条件によってはコロニー形態自体にも、違いが現れてくることもある。

【0031】このため、あらかじめ、一定濃度になるように微生物を液体培地中で増殖させておいて、それを一定量採ることによって一定数の微生物を試験で用いるようにする。濃度を一定にするためには、培養液中で飽和するまで、培養してやるのが便利である。

【0032】培地条件は、ここでは、M9最小培地に炭素源を一種類混合して作成した液体培地を用いた。炭素源は、クエン酸回路中の物質 (コハク酸など) から選んだ。以上の培地条件は、物質の種類、量ともに変更してもよいが、用いる微生物に相当であるかどうかをあらかじめ予備試験を行って決めておく必要がある。

【0033】なお、逐一述べないが、培地作成、及び、微生物の取り扱い時には、滅菌操作も含めて通常の微生物学的技術、ノウハウを用いる必要がある。

【0034】作成した培養液2mlに試験に用いる微生物を白金耳を用いて少量入れて、ミックスした後、37℃、120サイクル/分で24時間、振盪培養した。この培養により、およそ10の9乗から10乗個/ml程度の濃度に微生物濃度が上昇し、飽和した状態になる。この培養条件は、通常よく用いられている条件であり、一定の濃度にできればここに示した条件、方法に限定されるものではない。

【0035】濃度を調べるためには、培養液中の微生物を直接、顕微鏡観察でカウントしてもよいし、また分光光度計などを用いて、光の吸収率を測定して算定してもよいし、更に希釈して標準培地で培養し、作成されるコロニー数をカウントしてもよい。いずれも、微生物学の定法として確立されている方法であり、その手法に限定されるものではない。

【0036】一方、前記培養と平行して、培地を作成した。ここでは、寒天 (濃度: 0.25%)、M9塩類、4種類のアミノ酸 (L-メチオニン、L-スレオニン、

L-ロイシン、L-ヒスチジン)、炭素源 (コハク酸) とからなる培養液を作成した。この培養液を直径9cmのプラスチックシャーレに10mlずつ入れ、シャーレを2群に分けた。寒天が固まる前に、一群のシャーレには対照溶液としてエタノールをそれぞれ0.1mlずつ入れて攪拌し、もう一群のシャーレには試験サンプル溶液 (ノニルフェノール-内分泌攪乱物質として疑われている物質-をあらかじめ溶かしてあるエタノール) をそれぞれ0.1mlずつ入れて攪拌した。シャーレを室温に放置して、寒天を固まらせて、対照用と試験用の半流動性培地を作成した。

【0037】作成した対照培地と試験培地とに、それぞれ、前記で作成した微生物培養液10マイクロリットル (微生物数にして約10の7~8乗個) をシャーレの中央付近に点接種した。接種したシャーレは、25℃のインキュベーターに入れて、24時間から72時間、静置して培養した。ここで用いた大腸菌では、対照培地においては、72時間までには微生物が集まった小スポットが広く分布することが観察された。

【0038】スポット状に形成されたコロニーパターンを対照培地と試験培地との間で比較すると、そのスポットの数、サイズ、規則性などに明確な違いが見られた。この違いは、試験培地に入れた試験サンプル (この場合はノニルフェノール) が与えた影響である。

【0039】もし、環境から採取したサンプルなどを用いた場合に、こうした、差異が現れたならば、そのサンプル中になんらかの有害物質が含まれている可能性を示すことになる。定量的な比較のためには、写真撮影、ビデオ撮影を行い、コンピュータに取り込み、画像解析を行い、計測することが可能である。ここに現れた差異のみから、中に入っている有害物質の種類や、量などを推定することは、現状ではできないが、種々の物質、濃度で前記と同様な試験を行いコロニー形成の差異と物質との関係をデータベース化していけば、将来的に可能となると考えられる。

【0040】更に、これを種々の微生物についてのデータベースを作成しておき、同一の試験サンプルの影響を複数の微生物を用いて調べ、データベースと照合することで、詳しい評価が可能になる。

実施例2: 固形培地において紐状に増殖する微生物の利用例

〔微生物と移動性の確認〕この例では、固形培地において移動性を持つ微生物を用いて、一点に接種された微生物が紐状に連なったまま増殖を繰り返す、それにより広い面積をコロニーで占有できる微生物を利用した。ここでは、微生物として枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の1種類の株 (I2株) を用いた。固形培地上で広い範囲にわたってコロニーを増殖できるならばここで示した微生物以外でも同様に用いることができる。

【0041】但し、新規な微生物を用いる場合は、その

微生物の培地条件とコロニーのでき方の様式をある程度、あらかじめ把握しておくことが望ましい。コロニーパターンの観察は、以下に記す対照培地での培養と同様な方法を用いればよい。

〔培養と試験の方法〕発明の最初の工程は、微生物を一定濃度で培養する工程である。試験においては枯草菌を人工培地に接種し、その後のコロニー形成過程を観察する。このとき、微生物数が一定でないとコロニー形成に必要な時間、条件によってはコロニー形態自体にも、違いが現れてくる。

【0042】このため、あらかじめ一定濃度になるように微生物を液体培地中で増殖させておいて、それを一定量採ることで一定数の微生物を試験で用いることができるようにする。なお、濃度を一定にするために培養液中で飽和するまで、培養してやるのが便利である。

【0043】培地条件は、ここでは、ニュートリエントブロス（栄研）の10%溶液を用いた。この培地条件は、物質の種類、量ともに変更してもよいが、用いる微生物に相当であるかどうかをあらかじめ予備試験で決めておく必要がある。

【0044】作成した培養液2mlに試験に用いる微生物を白金耳を用いて少量入れて、ミックスした後、37℃、120サイクル/分で24時間、振盪培養した。この培養により、およそ10の9乗から10乗個/ml程度の濃度に微生物濃度が上昇し、飽和した状態になっている。この培養条件は、通常よく用いられている条件であり、一定の濃度にできればここに示した条件に限定されるものではない。濃度を調べるためには、前記した微生物学の定法として確立されている方法を用いる。

【0045】一方、前記培養と平行して、培地を作成した。ここでは、寒天（0.5%）、ニュートリエントブロス（10%）からなる培養液を作成した。この培養液を直径9cmのプラスチックシャーレに10mlずつ入れ、シャーレを2群に分けた。寒天が固まる前に、一群のシャーレには対照溶液としてエタノールをそれぞれ0.1mlずつ入れて攪拌し、もう一群のシャーレには試験サンプル溶液（ノニルフェノール-内分泌攪乱物質として疑われている物質-をあらかじめ溶かしてあるエタノール）をそれぞれ0.1mlずつ入れて攪拌した。シャーレを室温に放置して、寒天を固まらせて、対照培地と試験培地とを作成した。

【0046】作成した対照培地と試験培地とに、それぞれ、前記で作成した微生物培養液10マイクロリットル（微生物数にして約10の7～8乗個）をシャーレの中央付近に点接種した。接種したシャーレは、25℃のイ

ンキュベーターに入れて、24時間から72時間、静置して培養した。ここで用いた枯草菌では、対照培地においては、およそ24時間程度で直径3～5センチメートル程度のコロニーが観察された。

【0047】形成されたコロニーのパターンを対照培地と試験培地との間で比較した。マクロなコロニー形態については、定性的にはあまり大きな差異は見られなかった。

【0048】しかし、コロニーを形成する要素を顕微鏡で観察すると対照培地のコロニーは紐状につながった細胞で形成されていたが、試験培地のコロニーにおいては紐状につながった細胞も観察されたが、それに加えて細胞数にして数個程度の短い紐や、単一の細胞に分かれたものなどが観察された。定量的な比較のために、写真撮影を行い、コンピュータに取り込み、コロニーの直径、コロニーの面積、紐状部分の長さ、切断端の数、コロニー形態のフラクタル次元などを計測した。

【0049】いずれのパラメータについても対照培地と試験培地のコロニーの間に違いが見られた。この違いは、試験培地に入れたサンプル（この場合はノニルフェノール）が与えた影響である。もし、環境から採取したサンプルなどを用いた場合に、こうした、差異が現れたならば、そのサンプル中になんらかの有害物質が含まれている可能性を示すことになる。現状では、ここに現れた差異のみから、中に入っている有害物質の種類や、量などは推定できないが、種々の物質、濃度で前記と同様な試験を行い差異と物質との関係をデータベース化していけば将来的に可能になる。更に、これを種々の微生物についてのデータベースを作成しておき、同一の試験サンプルの影響を複数の微生物について調べ、データベースと照合することで、詳しい評価が可能になる。

【0050】

〔発明の効果〕以上の説明から明らかなように、本発明によれば、微生物の持つ増殖能力に加えて化学感覚も利用しているので、酵素活性のみの検出に比べて、感度よく測定ができる。また、物質の感受性の異なる性質を持つ微生物を組み合わせて用いることで多様な化学物質への対応が可能となる。

【0051】このため、一般環境の有害物質のモニターとして、試験サンプルに有害物質が存在するの可否かを低コストで、簡便、迅速に評価することができる。物理化学的な分析の前段階の試験法としての利用などのように様々な場面において有効利用が可能である。また、単独でも化学物質の毒性又は有害性の評価方法として利用が可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

(参考)

C 1 2 Q 1/24  
/(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:19)  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:125)  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:42)  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:425)  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:01)

C 1 2 Q 1/24  
(C 1 2 N 1/20 A  
C 1 2 R 1:19)  
(C 1 2 N 1/20 A  
C 1 2 R 1:125)  
(C 1 2 N 1/20 — A  
C 1 2 R 1:42)  
(C 1 2 N 1/20 A  
C 1 2 R 1:425)  
(C 1 2 N 1/20 A  
C 1 2 R 1:01)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**